

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

REC'D 31 JUL 1998

WIPO PCT

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"DNA-Sequenz codierend für eine Hydroxyphenyl-
pyruvatdioxygenase und deren Überproduktion
in Pflanzen"

am 14. Juli 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole C 12 N, A 01 H und C 07 H der Internationalen Patent-
klassifikation erhalten.

München, den 2. April 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Ebert

Patentzeichen: 197 30 066.9

Patentansprüche

1. DNA-Sequenz SEQ ID NO:1 und damit hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine HPPD.
2. Expressionskassette enthaltend einen Promotor und eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.
3. Expressionskassette nach Anspruch 2, enthaltend den CaMV35S-Promotor.
4. Expressionskassette nach Anspruch 2, enthaltend den samen-spezifischen Phaseolin-Promotor.
5. Expressionskassette nach Anspruch 2, wobei die DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 funktionell mit einem anderen Protein so verknüpft ist, daß ein gemeinsames Translationsprodukt entsteht.
6. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Transformation von Pflanzen.
7. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette gemäß Anspruch 2 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
8. Verfahren zur Transformation von Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - 1) die Expressionskassette nach Anspruch 2 in einen Agrobakterienstamm transferiert,
 - 2) die entstandenen rekombinanten Klone isoliert und
 - 3) diese zur Transformation von Pflanzen verwendet.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei die Transformation mit Hilfe des Stammes *Agrobacterium tumefaciens* erfolgt.
10. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der Elektroporation erfolgt.

2

11. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe der particle bombardment Methode erfolgt.
- 5 12. Pflanze mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 2 bis 5.
13. Pflanze gemäß Anspruch 12, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Gerste, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.
- 10 14. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 in Pflanzen exprimiert wird.
- 15 15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sequenz in einer Tabakpflanze exprimiert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 14 und 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression in den Blättern oder den Samen der Pflanze erfolgt.
- 20 17. Verwendung von Expressionskassetten gemäß den Ansprüchen 2 bis 5 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 in Pflanzen.
- 25 18. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.
- 30 19. Testsystem basierend auf der Expression einer Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.
- 35 20. Herbizide Wirkstoffe, identifizierbar mittels eines Testsystems gemäß Anspruch 19.
21. Verwendung einer Pflanze gemäß Anspruch 12 zur Herstellung pflanzlicher HPPD.
- 40 22. Verwendung der Expressionskassette gemäß Anspruch 2 zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.
- 45

3

23. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1.

5 24. Pflanze mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD enthaltend eine Expressionskassette gemäß den Ansprüchen 2 bis 5.

10

15

20

25

30

35

40

45

DNA-Sequenz codierend für eine Hydroxyphenylpyruvatoxygenase
und deren Überproduktion in Pflanzen

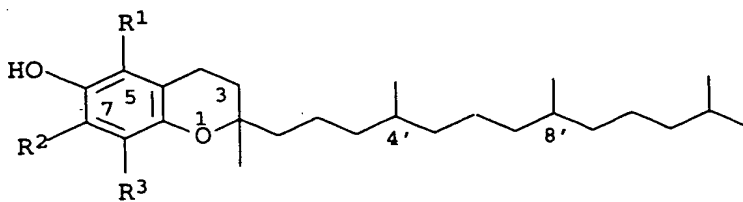
5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Expression eines exogenen oder endogenen HPPD-Gens in Pflanzen oder Pflanzen-
10 teilen. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der entsprechenden Nukleinsäuren kodierend für ein HPPD-Gen in trans-
genen Pflanzen, um diese resistent gegenüber Hemmstoffen der HPPD zu machen, sowie die Verwendung der DNA-Sequenz codierend für eine HPPD zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung
15 von Inhibitoren der HPPD.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant wäre auch die Ent-
20 wicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's
25 Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a - d) stammt von Tocol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a - d):

30



35

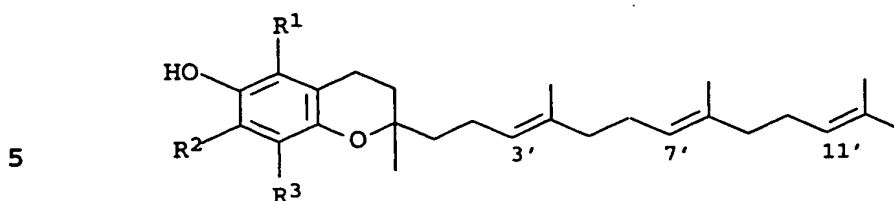
1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1b, β -Tocopherol [148-03-8]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$

40 1c, γ -Tocopherol [54-28-4]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$

1d, δ -Tocopherol [119-13-1]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

45



- 2a, α -Tocotrienol [1721-51-3]: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
10 2b, β -Tocotrienol [490-23-3]: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
2c, γ -Tocotrienol [14101-61-2]: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
2d, δ -Tocotrienol [25612-59-3]: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt α -Tocopherol.

15

Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Vitamin E-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können
20 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch
25 wäre die Erhöhung des Vitamin E Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

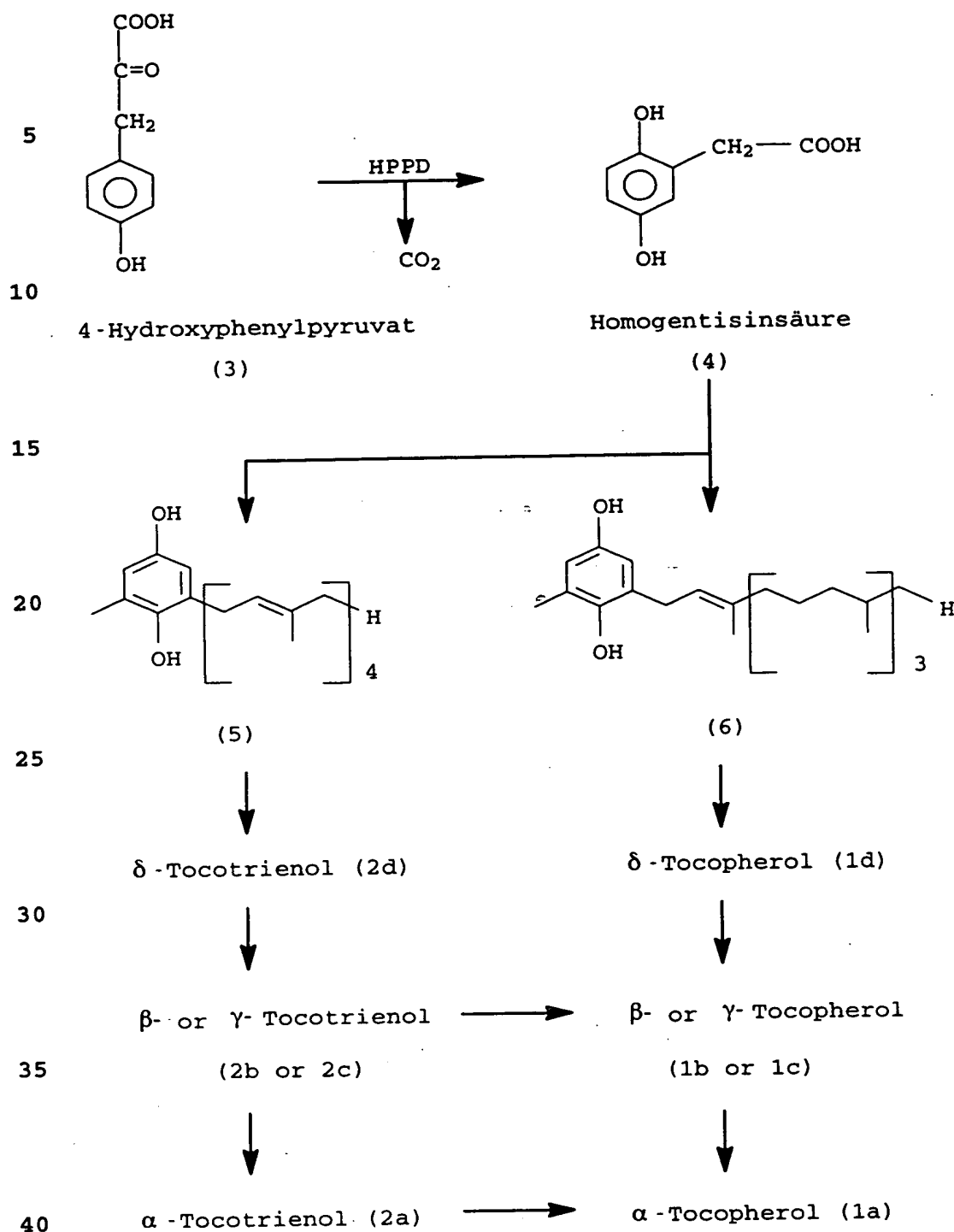
Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, ein für die Vitamin E Syntheseleistung kodierendes, essentielles Biosynthese-
30 gen zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

35

Die Tocopherol-Biosynthese in Pflanzen und Algen verläuft bekannt wie folgt:

40

45



Vorstufe des aromatischen Rings der Tocopherole ist p-Hydroxyphenylpyruvat (3), das enzymatisch mit Hilfe des Enzyms Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD) in Homogentisinsäure (4) umgewandelt wird, die mit Phytylpyrophosphat unter Eliminierung von CO_2 zur Vorstufe (6) reagiert. Der Tocotrienolbiosyntheseweg

4

beginnt mit der Kondensation von Homogentisinsäure(4) mit Geranylgeranylpyrophosphat zur Vorstufe (5). Die enzymatische Cyclisierung der Vorstufen 5 oder 6 führt zu δ - Tocotrienol bzw. zu δ - Tocopherol. Einige dieser Biosyntheseenzyme wurden isoliert.

5

Bei der Suche nach Arabidopsis-Mutanten, die Defekte in der Carotinoidbiosynthese aufweisen, wurde eine Mutante mit weißem Phänotyp identifiziert, die keine aktive HPPD bilden kann. Wenn die als *pds2* bezeichnete Mutante in Gegenwart von Homogentisinsäure
 10 angezogen wird, bildet sie wie der Wildtyp Carotinoide und ergrünt (Norris et al., Plant Cell (1995) 7: 2139 - 2149). Diese Untersuchung zeigt, daß die Aktivität der HPPD Voraussetzung für die Ausbildung photosynthetisch aktiver Chloroplasten ist. Ohne dieses Enzym werden keine Plastochinone gebildet, die als Akzeptoren für freigesetzte Reduktionsäquivalente während der Carotinoidbiosynthese erforderlich sind (Phytoendesaturierung). Die Schlüsselrolle der HPPD im plastidären Stoffwechsel macht sie zu einem interessanten Target für Herbizide. Sulcotrione hemmen die Aktivität des Enzyms effektiv (Schultz et al., FEBS Lett. (1993)
 15 20 318: 162 - 166).

Von den im folgenden genannten Organismen sind bereits Sequenzen HPPD spezifischer Gene bekannt:

25

Organismus	Sequenzname	Zugangsnummer Datenbank
Mensch	HPPD_HUMAN	X72389
Schwein	HPPD_PIG	D13390
30 Ratte	HPPD_RAT	M18405
Maus	HPPD_MOUSE	D29987
Streptomyces avermitilis	SA11864	U11864
35 Pseudomonas sp. strain P.J. 874	HPPD_PSESP	P80064
Arabidopsis	HPPD_ARAB1	AF900228
	HPPD_ARAB2	U89267

40 Desweiteren sind folgende Sequenzen mit deutlicher Homologie zu HPPD-Sequenzen in den Datenbanken zu finden:

PEA3_MOUSE: Mus muscula (Maus) PEA3 polypeptide, AC X63190;

45 MELA_SHECO: Shewanella colwelliana, melA Protein, AC M59289,

5

In WO 96/38567 wird die HPPD DNA-Sequenz aus *Arabidopsis thaliana* und *Daucus carota* beschrieben.

Sowohl für die Anwendung im Pflanzenschutz zur Erzeugung Herbizid-resistenter Pflanzen als auch für die Erhöhung der Vitamin E-Synthese in Pflanzen - beispielsweise zur Erzeugung von Futtermitteln mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt - ist die Kenntnis der HPPD-DNA-Sequenzen unbedingte Voraussetzung.

- 10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt.

Weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer gegen Inhibitoren der HPPD resistenten transgenen Pflanze.

- 15 Beide Aufgaben wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines HPPD-Gens in den Pflanzen.

- Zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.

- Diese Aufgabe wurde gelöst durch die Expression eines HPPD-Gens aus Gerste in einer Pflanze bzw. einem Mikroorganismus und anschließende Testung von Chemikalien auf Hemmung der HPPD-Enzymaktivität.

- Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft die Klonierung des vollständigen HPPD-Gens aus Gerste über die Isolierung der für das HPPD-Gen spezifischen cDNA (HvSD36).

- Während der Blattseneszenz tritt eine deutliche Erhöhung des Vitamin E-Gehalts in den Blättern auf (Rise et al., Plant Physiol. (1989) 89: 1028 - 1030). Das monokotyle Blatt der Gerste stellt einen Gradienten von Zellen unterschiedlichen Alters dar, da das Blatt ein basal gelegenes Meristem hat, von dem sich sukzessive neue Zellen abspalten. Somit liegen die ältesten Zellen an der Spitze des Blattes und die jüngsten an der Basis. Abb. 1 zeigt eine schematische Zeichnung des Primärblattes der Gerste an verschiedenen Tagen nach Aussaat. Die ermittelte Gesamtlänge der Blätter ist in der Skala links zu entnehmen. Eingezeichnet und mit I - IV benannt sind die für die Analyse der Genexpression ausgewählten verschieden weit differenzierten Blattbereiche des Primärblattes. Die Pflanzen wurden in einem täglichen Licht/Dunkel-Wechsel (L/D) angezogen bzw. zur Induktion der Seneszenz nach 6 Tagen abgeschnitten und für 2 Tage dunkel (2 nD) inkubiert. Eine "Northern blot"-Analyse mit RNA aus

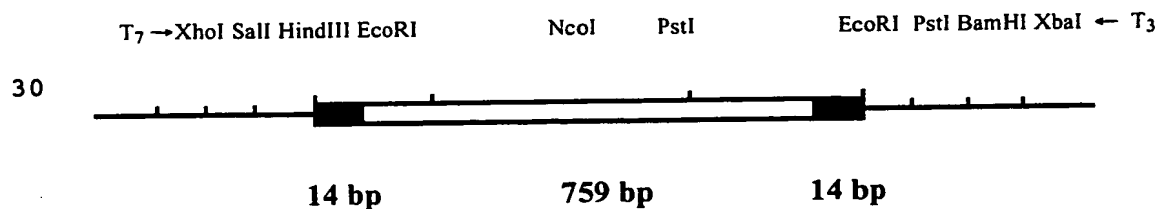
6

verschieden weit differenzierten Bereichen des Primärblattes der Gerste (siehe Abb. 2) deuten auf eine entwicklungsabhängig gesteuerte Expression der HPPD der Gerste hin. So findet eine starke Akkumulation des ca. 1600 nt langen Transkriptes im meristematischen Bereich an der Basis des Primärblattes (I) statt. Der Gehalt an diesem Transkript fällt mit zunehmendem Alter des Gewebes ab (IIa und IIb) und steigt in den voll ausdifferenzierten Zellen mit ausgereiften Chloroplasten (III) wieder an. In seneszierenden Bereichen des Primärblattes (IV) ist schließlich der Gehalt am 1600 nt langen Transkript am höchsten. Zusätzlich ist nur in den meristematischen Zellen an der Basis des Primärblattes ein ca. 3100 nt langes Transkript zu detektieren. Auch dieses Transkript ist in zunehmender Reifung des Gewebes nicht mehr nachweisbar.

15

Mit Hilfe des sogenannten "Differential Display"-Verfahrens wurde zunächst ein 207 bp cDNA-Fragment isoliert, dessen entsprechendes Transkript bei dunkelinduzierter Seneszenz im Primärblatt der Gerste akkumuliert. Dieses Fragment (Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: Nukleotidposition 1342 - 1549) wurde anschließend als Sonde verwendet, um in einer cDNA-Bank (in λ -ZAP-II) aus seneszierenden Fahnenblättern der Gerste einen cDNA-Klon mit größerem Insert zu isolieren.

25 Schematische Darstellung des cDNA-Teilklons HvSD 36 aus der λ -ZAP-II-Bank:



35

Das cDNA-Fragment (Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: Nukleotidposition 771 - 1529) wurde in die EcoRI Schnittstelle von pBluescript(SK-) kloniert. An beiden Enden der cDNA befindet sich zusätzlich eine 14 bp Adaptorsequenz, die zur Ligation in den λ -ZAP-II benötigt wurde. Eingezeichnet sind ausgewählte Restriktionschnittstellen des Vektors sowie der cDNA selbst.

Das 759 bp lange cDNA-Fragment wurde als Sonde für einen weiteren Versuch verwendet, um eine vollständige Sequenz von HvSD 36 zu erlangen. Zu diesem Zweck stand eine cDNA Bank aus RNA des meristematischen Bereichs 5 Tage alter Gerstenkeimlinge zur Verfügung. Für diese cDNA Bank wurde der Lambda Phage ExCell Eco

RICIP von Pharmacia (Freiburg) (Produkt Nummer: 27-5011, 45.5kb) verwendet.

Es konnte ein 1565 bp langer cDNA-Klon isoliert werden, siehe
5 Sequenzprotokoll: Sequenz ID NO:1: und 2.

Die 434 Aminosäuren lange Proteinsequenz weist unter den in den Datenbanken befindlichen Sequenzen mit 58 % die höchste Homologie zur Sequenz der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* auf.

10

Zur Auffindung eines genomischen Klonen, der die vollständige Gensequenz der HPPD beinhaltet, wurde eine Lambda FIXII-Bank der Gerste von der Firma Stratagene (Heidelberg, Produkt Nummer 946104) bezogen. Zur Herstellung der Bank diente DNA aus

- 15 etiolierten Blättern der Wintergerste cv. Igri. Die DNA wurde partiell mit Sau3AI verdaut. Vor der Klonierung in die XhoI-Schnittstelle des Vektors erfolgte eine Auffüllung der Fragmentenden und der Phagenarme mit Nukleotiden. Die Durchmusterung der Bank mit 200.000 pfu in der ersten Runde ergab nur einen
20 Klon, der mit der cDNA HvSD36 hybridisierte. Nach Restriktionsverdau dieses rekombinanten Phagen mit PstI und SacI konnten anschließend Fragmente mit Größen von 5400, 3800 und 1800bp isoliert werden, die bei einer "Southern"-Blot-Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde detektierbar sind. Diese Subfragmente liegen
25 kloniert im Bluescript-Vektor vor. Abbildung 3 zeigt den schematischen Aufbau des HPPD-Gens der Gerste.

- Gegenstand der Erfindung sind insbesondere Expressionskassetten, deren Sequenz für eine HPPD oder deren funktionelles Äquivalent
30 kodiert, sowie deren Verwendung zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Vitamin E Gehalt. Die Nukleinsäuresequenz kann dabei z.B. eine DNA- oder eine cDNA-Sequenz sein. Zur Insertion in eine erfindungsgemäße Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine HPPD kodieren
35 und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Vitamin E verleihen.

- Die erfindungsgemäßen Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der
40 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine erfindungsgemäße Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elementen-
45 te, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das HPPD-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor,

8

kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaic-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987) 8693 - 8711).

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 4 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

Als Promotoren der erfindungsgemäßen Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980) 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195 - 2202).

Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen HPPD-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-

induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die
5 Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen
die Biosynthese von Vitamin E bzw. dessen Vorstufen stattfindet.
Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische
Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der
cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor
10 aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445 - 245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremd-
protein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten
löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen
15 exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995),
1090-1094). Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann daher
beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den
Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al.
Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor
20 (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu
exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten. Der
Aufbau einer derartigen Kassette ist in der Abbildung 4
schematisch beispielhaft dargestellt.

25 Die Herstellung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette
erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer
geeigneten HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen
Promotor und HPPD-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein
chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem
30 Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und
Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis,
E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory
Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
(1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist,
35 Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory,
Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al.,
Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc.
and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

40 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den
Apoplasten, in Plastiden, die Vakuole, das Mitochondrium, das
Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen ent-
sprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment
des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev.
45 Plant Sci. 15, 4 (1996), 285 - 423). Für die Menge der Protein-
akkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen

hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al. , Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792).

- Gegenstand der Erfindung sind auch Expressionskassetten, deren
- 5 DNA-Sequenz für ein HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Besonders bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des HPPD-Gens in die Chloroplasten vom HPPD-Teil
- 10 enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. das Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.
- 15 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine HPPD kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen
- 20 mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert
- 25 werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.
- 30 Zweckmäßigerweise können die erfindungsgemäßen Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der
- 35 Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der erfindungsgemäße Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch
- 40 fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die erfindungsgemäße Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den erfindungsgemäßen Promotor, eine beliebige DNA-Sequenz und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig
- 45 austauschbar.

11

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primer-repair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al. Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

Eine erfindungsgemäße Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den

12

transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die erfindungsgemäße Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines HPPD-Gens enthalten.

5

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine HPPD kodierenden DNA wird eine erfindungsgemäße Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale,

10 beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

15 Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die erfindungsgemäßen Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184.

20 Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Transformation

25 von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch

30 in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

35 Die erfindungsgemäße Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Vitamin E-Produktion eingesetzt werden.

40 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplasten-

45 transformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation

14

- Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft der Erhöhung des Vitamin E Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des HPPD-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die HPPD Aktivität aufweisen oder durch *in vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden Pflanze leicht ermitteln.
- 15 Als weitere erfindungsgemäße geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei Bestandteil des Fusionsproteins ein pflanzliches HPPD-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf HPPD-Expression möglich ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal- oder Transitpeptid, das das HPPD-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Gegenstand der Erfindung sind aber auch die erfindungsgemäß erzeugten Expressionsprodukte sowie Fusionsproteine aus einem Transitpeptid und einem Polypeptid mit HPPD-Aktivität.

- 30 Erhöhung des Vitamin E-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Vitamin E-Biosyntheseleistung durch funktionelle Überexpression des HPPD-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzen-generation.

- Der Biosyntheseort von Vitamin E ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des HPPD-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Vitamin E-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze -beispielsweise in fett-haltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

15

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen HPPD-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

- 5 Die Wirksamkeit der Expression des transgen experimentierten HPPD-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des HPPD-Gens und deren Auswirkung auf die Vitamin E-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen
10 getestet werden.

- Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer erfindungsgemäßen Expressionskassette, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher
15 Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

- 20 Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

- Wie bereits erwähnt ist die HPPD ein geeignetes Target für Herbizide vom Typ der Sulcotrione. Um noch effizientere Hemm-
25 stoffe der HPPD finden zu können, ist es notwendig, geeignete Testsysteme, mit denen Inhibitor-Enzym-Bindungsstudien durchgeführt werden können, zur Verfügung zu stellen. Hierzu wird beispielsweise die komplette cDNA-Sequenz der HPPD aus Gerste in einen Expressionsvektor (pQE, Qiagen) kloniert und in *E. coli*
30 überexprimiert.

- Das mit Hilfe der erfindungsgemäßen Expressionskassette expri-
mierte HPPD-Protein eignet sich besonders zur Auffindung von für die HPPD spezifischen Hemmstoffen.

- 35 Dazu kann die HPPD beispielsweise in einem Enzymtest eingesetzt werden, bei dem die Aktivität der HPPD in An- und Abwesenheit des zu testenden Wirkstoffs ermittelt wird. Aus dem Vergleich der beiden Aktivitätsbestimmungen läßt sich eine qualitative und
40 quantitative Aussage über das Hemmverhalten des zu testenden Wirkstoffes machen.

- Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Testsystems kann eine Vielzahl von chemischen Verbindungen schnell und einfach auf herbizide
45 Eigenschaften überprüft werden. Das Verfahren gestattet es, reproduzierbar aus einer großen Anzahl von Substanzen gezielt solche mit großer Wirkstärke auszuwählen, um mit diesen Sub-

16

stanzen anschließend weitere, dem Fachmann geläufige vertiefte Prüfungen durchzuführen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Herbizide, die mit dem 5 oben beschriebenen Testsystem identifizierbar sind.

Durch Überexpression der für eine HPPD kodierenden Gensequenz Seq ID NO: 1 in einer Pflanze wird eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD erreicht. Die derart hergestellten 10 transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 15 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine erfindungsgemäße Expressionskassette in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 20 - Verwendung einer Pflanze zur Herstellung pflanzlicher HPPD.
- 25 - Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD durch verstärkte Expression einer erfindungsgemäßen DNA-Sequenz.
- 30 - Verwendung der erfindungsgemäßen Expressionskassette zur Herstellung eines Testsystems zur Identifizierung von Inhibitoren der HPPD.

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, 35 ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungs- 40 rungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombi- 45 nanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring

17

Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bzw. Pharmacia im Fall von NP66 bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in (Nucl. Acids Res. 13 (1985) 4777) beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221 - 230) benutzt werden.

Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

Erzeugung pflanzlicher Expressionskassetten

In das Plasmid pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. (1984) 12, 8711) wurde ein 35S CaMV Promotor als EcoRI-KpnI-Fragment entsprechend den Nukleotiden 6909 - 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus (Franck et al. Cell 21 (1980) 285) inseriert. Das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmides pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835), Nukleotide 11749 - 11939 wurde als PvuII-HindIII-Fragment isoliert und nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle zwischen die SphI-HindIII Schnittstelle des Vektors pBmAR-Hyg kloniert. Es entstand das Plasmid pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990) 221 - 230).

Anwendungsbeispiele

40 Beispiel 1

Isolierung von HPPD-spezifischen cDNA Sequenzen

Mit Hilfe der von Liang und Pardee (Science (1992) 257, 967 - 972) publizierten Methode der DDRT-PCR wurde die Zusammensetzung der mRNA-Population aus Primärblättern von neun Tage in einem L/D-Wechsel (16 h Licht/ 8 h Dunkel) angezogenen Gerstenpflanzen

18

verglichen mit der von Primärblättern 11 Tage alter Gerstenpflanzen, in denen nach neun Tagen Anzucht anschließend Seneszenz durch zweitägige Dunkelbehandlung induziert wurde (Humbeck und Krupinska, J. Photochem. Photobiol. 36 (1996), 321 - 326).

- 5 Jeweils 0,2 µg der gesamten RNA wurde mit dem Enzym "Superskript RT" (Gibco BRL, Eggenstein) in cDNA umgesetzt. Dabei enthielten die Reaktionsansätze (20 µl) neben der RNA außerdem 20 µM dNTPs, 10 µM DTT, 1xRT-Puffer und je 1 µM (dT)₁₂VN-Primer. Die Synthese der für diese Reaktionen erforderlichen Anker-"Primer" erfolgte
- 10 aufgrund der Angaben von Liang und Pardee:

1. 5'-TTTTTTTTTTTTTAG-3'
2. 5'-TTTTTTTTTTTTTCA-3'
3. 5'-TTTTTTTTTTTTTAC-3'
- 15 4. 5'-TTTTTTTTTTTTTGT-3'

Nach Synthese der cDNAs erfolgte die Amplifikation der entsprechenden Sequenzen in jeweils zehn Ansätzen, die sich durch Verwendung der im folgenden angegebenen Zufalls-"Primer" unterscheiden:

20 scheiden:

- | | |
|------------------------|----------------------|
| 1. 5'-TACAACGAGG-3' | 2. 5'-GGAACCAATC-3' |
| 3. 5'-AAACTCCGTC-3' | 4. 5'-TGGTAAAGGG-3' |
| 5. 5'-CTGCTTGATG-3' | 6. 5'-GTTTTCGCAG-3' |
| 25 7. 5'-GATCTCAGAC-3' | 8. 5'-GATCTAACCG-3' |
| 9. 5'-GATCATGGTC-3' | 10. 5'-GATCTAAGGC-3' |

Die PCR-Reaktionsansätze enthielten in einem Volumen von jeweils 20 µl 1xPCR-Puffer, 2 µM dNTPs, 2,5 µCi (α ³²P)-dATP, 1 µM (dT)₁₂VN-"Primer", 1/10 Vol. RT-Mix (Sambrook et al. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 1989), 1 U Taq DNA-Polymerase (Boehringer, Mannheim) und 1 µM 10-mer Zufalls-"Primer". Die PCR-Reaktionen liefen nach folgendem Programm in einem Uno-Block (Biometra) ab:

- 35
1. 94°C 2 min
 2. 94°C 30 s
 3. 40°C 2 min
 4. 72°C 30 s
 - 40 5. 72°C 5 min
 6. 4°C Aufbewahrung bis zur weiteren Bearbeitung

Die Schritte 2, 3 und 4 wurden 40-mal nacheinander durchgeführt. Dabei ergaben sich etwa 100 cDNA-Banden pro Reaktion und

45 "Primer"-Kombination.

19

Abweichend von der Vorschrift von Liang und Pardee erfolgte die Auftrennung der amplifizierten cDNA-Fragmente in nichtdenaturierenden Polyacrylamidgelen folgender Zusammensetzung: 6 % (w/v) Acrylamid (Long Ranger, AT Biochem), 1,2 x TBE-Puffer, 0,005 % (v/v) TEMED und 0,005 % (w/v) APS (Bauer et al, Nucl. Ac. Res. (1993) 21, 4272 - 4280).

- Je 3,5 µl jedes PCR-Ansatzes wurden mit 2 µl Probenpuffer (dye II, Sambrook et al., 1989) versetzt und dann auf das Gel aufgetragen.
- 10 Um die Reproduzierbarkeit der cDNA-Bandenmuster zu erfassen (Abb. 5), wurden von an den Tagen 9 und 11 geernteten Primärblättern der Gerste jeweils zwei unabhängige RNA-Präparationen angefertigt (9 und 9' bzw. 11 und 11') und parallel in der nachfolgenden Analyse eingesetzt. Dargestellt ist das Ergebnis für zwei
- 15 verschiedene Primerkombinationen (A und B), wobei exemplarisch zwei Unterschiede im Bandenmuster zwischen der Probe von Tag 9 und 11 durch Pfeile hervorgehoben wurden. Nur solche Banden, die in den beiden Proben aus seneszierenden Pflanzen gleichermaßen und in den beiden Vergleichsproben nicht vorkamen, wurden bei der
- 20 späteren Analyse der Gele beachtet. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 2,5 h bei 40 Watt (0,8 W/cm³) in 1 x TBE-Puffer. Nach erfolgter Trennung der cDNA-Fragmente wurde das Gel auf Filterpapier (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Nach Trocknung des Gels bei 50°C wurde ein Röntgenfilm aufgelegt. cDNA-
- 25 Banden, die im Autoradiogramm nur bei den Proben 11 und 11' auftraten, wurden mittels eines Skalpells aus dem trockenen Gel herausgeschnitten und die DNA durch Kochen in 100 µl 1 x TE-Puffer eluiert. Die mit Ethanol gefällte DNA wurde für die weiteren Untersuchungen in 10 µl Wasser resuspendiert. Nach Reamplifikation
- 30 mit den für diesen Ansatz zuvor verwendeten "Primern" konnte die DNA kloniert und sequenziert sowie auch als Sonde für Northern-Blot-Hybridisierungen eingesetzt werden.

Um zu prüfen, ob das entsprechende cDNA-Fragment tatsächlich ein

35 seneszenzspezifisch auftretendes Transkript repräsentiert, erfolgten Hybridisierungen mit RNA aus Blättern verschiedener Entwicklungsstadien:

- 40 A. 1. RNA aus Primärblättern von 9 Tage im L/D-Wechsel angezogenen Pflanzen
- A. 3. RNA aus Primärblättern von 10 Tage alten Pflanzen, bei deren Anzucht am Tag 10 die Lichtphase ausfiel
- 45 A. 4. RNA aus Primärblättern von 11 Tage alten Pflanzen, die am Tag 10 und 11 keine Lichtphase mehr hatten

20

A. 5 RNA aus Primärblättern von 12 Tage alten Pflanzen, die nach 2 Tagen Dunkelheit wieder eine Lichtphase erfahren haben

5 Die Proben für die RNA-Analyse wurden jeweils in der Mitte der ursprünglichen Nachtphase geerntet.

10 B. RNA aus Fahnenblättern, die zu sieben verschiedenen Zeitpunkten im Freiland gesammelt wurden (Abb. 6). Die Blätter waren am 29. Mai voll ausgewachsen und wiesen am 21. Juni weniger als 10 % des ursprünglichen Chlorophyllgehalts auf. Der Beginn der Seneszenzprozesse ist in Abbildung 6 durch einen Pfeil angegeben (d.h. 17 Tage nach Erreichen der vollen Länge am 15. Juni). Als Seneszenzbeginn wurde der Tag definiert, an dem die Photosystem II-Effizienz abnahm (Humbeck et al., Plant Cell Environment (1996) 19: 337 - 344).

Zur Hybridisierung eines Filters mit den beschriebenen RNA-Proben wurde neben der HPPD-Sonde zum Vergleich auch eine spezifische Sonde für das *rbcS*-Gen, das für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase kodiert, eingesetzt. Abbildung 6 zeigt die Hybridisierung der "Northern-Blots" A und B mit der cDNA HvSD36 und einer für das *rbcS*-Gen spezifischen Sonde.

25 Filter A trägt RNA aus Primärblättern der Gerste nach 9 Tagen Anzucht im L/D-Wechsel (9), nach anschließender ein- bzw. zeltägiger Dunkelinkubation (10, 11) und nach daran anschließender erneuter Belichtung für einen Tag (12). Filter B enthält RNA aus Fahnenblättern, die 1992 im Zeitraum vom 29.05. bis 21.06. im Freiland geerntet wurden. Der Pfeil gibt den Beginn der Sequenz am 15.06. an. Wie aus der Abbildung 6 ersichtlich, ist die Menge an *rbcS*-spezifischer mRNA dann hoch, wenn die Menge an der für die HPPD spezifischen mRNA relativ gering ist. Die für die HPPD spezifische mRNA ist in Primärblättern neun Tage alter Pflanzen vor dem Transfer ins Dunkel nicht nachweisbar und akkumuliert deutlich während der Dunkelphase. Bei Wiederbelichtung der Pflanzen nimmt die Menge an dieser mRNA deutlich ab. Im Fall der Fahnenblätter sind bereits in voll ausgewachsenen, nicht seneszenten Blättern geringe Mengen der für die HPPD spezifischen mRNA nachweisbar. Zu einer verstärkten Expression kommt es bereits 4 Tage vor dem eigentlichen Seneszenzbeginn. Die höchste Menge dieser mRNA liegt in seneszenten Blättern vor. Ein Größenvergleich mit bekannten RNA-Spezies ergab, daß das mit der cDNA-Sonde HvSD36 (S: Seneszenz; D:Dunkel, Fragmentnummer 36 im DDRT-Gel) detektierte Transkript eine Länge von ca. 1,6 kb aufweist.

21

Durch DDRT-PCR wurden unabhängig voneinander drei cDNA-Fragmente erhalten, die dieses Expressionsmuster ergaben und aufgrund der Sequenzanalyse tatsächlich dasselbe Transkript repräsentieren. Das längste Fragment hatte eine Größe von 230 bp. Das 230 bp große PCR-Produkt wurde schließlich mit dem "Sure Clone™ Ligation Kit" (Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pUC18 kloniert. Das rekombinante Plasmid wurde in kompetente Zellen des E. coli-Stamms DH5 α transformiert. Da das Fragment, methodisch bedingt, das 3'-Ende des zugehörigen Transkripts repräsentiert, reichte die Sequenzinformation zunächst nicht aus, um eine eindeutige Homologie mit einer Sequenz in den Datenbanken ausfindig zu machen. Um eine längere zugehörige cDNA zu isolieren, wurde eine Lambda ZAPII-Bank (Stratagene, Heidelberg) aus RNA seneszenten Fahnenblätter unter Verwendung des 230 bp großen Fragments als Sonde durchmustert. Für diesen Arbeitsschritt erfolgte eine Markierung der Sonde mit Dig-dUTP nach Angaben des "DNA-Labeling and Detection Kit" (Boehringer, Mannheim). Die Untersuchung der Bank erfolgte nach dem Protokoll des "ZAP-cDNA Synthesis Kit" (Stratagene, Heidelberg).

Im Fall der hier beschriebenen Sonde wurden 150.000 pfu überprüft. Davon gaben 39 Phagenplaques ein positives Signal. Davon wurden 12 Phagenpopulationen weiter bearbeitet. Nach einer Phagenpräparation konnten die inserierten Fragmente über PCR angereichert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Southern-Blot Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde wurden aus den so behandelten 12 Phagenpopulationen diejenigen ausgewählt, die die größten "Inserts" mit positivem Signal aufwiesen. Nach erneutem Ausplattieren wurden die Phagen einer weiteren Hybridisierung unterzogen. Vereinzelte Phagenplaques wurden ausgestochen und nach Elution unter Verwendung eines Helferphagen einer *In vivo* Excision nach dem Protokoll von Stratagene (Exassist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR™ Strain) unterzogen. Die aus dieser Behandlung hervorgehenden sogenannten "Phagemide" enthalten die im pBLueskript (SK-) klonierte cDNA.

Nach einer anschließenden Plasmidpräparation konnte das betreffende "Insert" mit EcoRI aus dem Bluescript-Plasmid herausgeschnitten werden. Der im Fall der HvSD36 cDNA erhaltene cDNA-Klon enthält ein "Insert" mit einer Größe von ca. 800 bp. Die vollständige Sequenzierung der cDNA erfolgte mit dem "SequiTherm Excel Long-Read DNA-Sequenzierungs-Kit" (Epicentre Technologies, Biozym Diagnostic, Oldendorf) unter Verwendung von mit IRD41 markierten Universal-"Primern", die an Sequenzbereiche im Bluescript-Vektor binden. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte über den Infrarotlaser des automatischen Sequenzierers 4000L

22

der Firma Licor. Nach Sequenzierung lag eine genau 759 bp lange Sequenz vor, die an den Seiten von einer jeweils 14 bp langen Adaptorsequenz flankiert ist. Diese Adaptorsequenzen dienten bei der Herstellung der cDNA-Bank zur Ligation der cDNA-Fragmente mit den Armen des Phagen Lambda ZAPII (Stratagene, Heidelberg).

Die Proteinsequenz HvSD36, die insgesamt über 180 Aminosäuren verfügt, weist unter den in den Datenbanken befindlichen Sequenzen mit 41 % die höchste Homologie zur Sequenz der HPPD des Menschen auf. In Anbetracht der Länge des im "Northern-Blot" detektierten Transkripts (ca. 1600 nt) ist anzunehmen, daß von der cDNA noch 850-900 bp fehlen.

Zur Vervollständigung der cDNA wurde eine weitere cDNA Bank untersucht. Aus dem basalen meristematischen Bereich 5 Tage alter Gerstenkeimlinge wurde mit Hilfe von "Dynabeads" (Dynal, Hamburg) mRNA isoliert und mit dem "Time Saver cDNA SyntheseKit" (Pharmacia, Freiburg) in cDNA überschrieben. Es folgte eine Ligation von EcoRI/NotI-Adaptoren (Pharmacia, Freiburg) an die cDNA mit anschließender Ligation in den Lambda ExCell Vektor (Pharmacia, Freiburg). Schließlich wurde die rekombinante Phagen-DNA mit Hilfe des "Gigapack II Gold Set" (Stratagene, Heidelberg) in Phagenproteine verpackt. Mit der 759 bp langen Sonde HvSD36 wurden 400000 pfu überprüft, wobei 5 Phagen von der Sonde detektiert wurden. Eine Excision der "Phagemids" aus dem Phagen erfolgte *in vivo* mit Hilfe des Bakterienstammes NP66 nach den Angaben von Pharmacia (Freiburg). Aus einzelnen Bakterienkolonien wurden die rekombinanten pExCell-Plasmide isoliert und zur Vermehrung in den Bakterienstamm D115 α überführt.

Der längste auf diesem Weg isolierte cDNA-Klon HvSD36 hat eine Länge von 1565 bp und wurde vollständig sequenziert (siehe Sequenzprotokoll).

35 Beispiel 2

Charakterisierung der genomischen Sequenz

Zur Auffindung eines genomischen Klones, der die Gensequenz der HPPD beinhaltet, wurde eine Lambda FIXII-Bank der Gerste von der Firma Stratagene (Heidelberg) bezogen. Zur Herstellung der Bank diente DNA aus etiolierten Blättern der Wintergerste cv. Igri. Die DNA wurde partiell mit Sau3AI verdaut. Vor der Klonierung in die XhoI-Schnittstelle des Vektors erfolgte eine Auffüllung der Fragmentenden und der Phagenarme mit Nukleotiden. Die Durchmusterung der Bank mit 200.000 pfu in der ersten Runde ergab nur einen Klon, der mit der cDNA HvSD36 hybridisierte. Nach

23

Restriktionsverdau dieses rekombinanten Phagen mit PstI und SacI konnten anschließend Fragmente mit Größen von 5400, 3800 und 1800 bp isoliert werden, die bei einer "Southern"-Blot-Hybridisierung mit der HvSD36-Sonde detektierbar sind. Diese Subfragmente liegen kloniert im Bluescript-Vektor vor.

Die Durchmusterung der Bank erfolgte nach der für die HybondN-Membran angegebenen Vorschrift. Die Markierung der Sonde für die Durchmusterung der Bank sowie für "Southern"-Blot-Hybridisierung erfolgte über "Random Priming" mit ^{32}P -dATP unter Verwendung des Klenow-Enzyms (Sambrook et al., (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Es wurde ein genomischer "Southern-Blot" mit gesamter DNA aus Gerste (Carina) durchgeführt (Abb. 7). Je 15 µg DNA wurden mit BamHI (B), EcoRI (E), HindIII (H) oder XbaI (X) verdaut und in einem 0.75 % Agarose Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Hybond N+ Membran (Amersham, Braunschweig) erfolgte eine Hybridisierung mit der unvollständigen 759bp langen cDNA Sonde von HvSD36 nach Angaben des Herstellers der Membran. Dabei konnten folgende Fragmente detektiert werden:

BamHI: 6.0, 3.9 und 3.0 kbp
 EcoRI: >10kbp
 HindIII: 8.3, 2.6, 1.1 und 1.0 kbp
 XbaI: 9.0, 5.2 und 4.2kbp

Die Längen der Fragmente wurden durch Vergleich mit einem DNA Größenstandard (Kb-Leiter von GibcoBRL, Eggenstein) abgeschätzt.

Beispiel 3

Homologievergleich der Proteinsequenz von HvSD36

Ein Vergleich der Proteinsequenz von HvSD36 mit Proteinsequenzen in den Datenbank ergab Homologien zu folgenden bisher bekannten Proteinsequenzen:

	10	20	30	40	50
HPPD_HvMP	PTPTTPAATG
HPPD_AthMGHQNA	VSENQNHDDG
HPPD_HUMAN
HPPD_RAT
HPPD_PIG
HPPD_MOUSE
HPPD_PSESP
MELA_SHECO
PEA3_MOUSE	MTKSSNHNCL	LRPENKPGLW	GPGAQAASLR	PSPATLVVSS	PGHAEHPPAA

24

	60	70	80	90	100
HPPD_Hv	AAAAVTPEHA	RPHRMVRFNP	RSDRFHTLSF	HHVEFWCADA	ASAAGRFAFA
HPPD_Ath	AASSPGFKLV	GFSKFVRKNP	KSDKFKVKRF	HHIEFWCGDA	TNVARRFSWG
HPPD_HUMAN	M	TTYSDKGAKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCSK
HPPD_RAT		YWDKGPKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCNK
5 HPPD_PIG	M	TSYSDKGEKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASYYCSK
HPPD_MOUSE	M	TTYNNKGPKP	ERGRFLH--F	HSVTFWVGNA	KQAASFYCNK
HPPD_PSESP			ADLYENP	MGLMGFEFIE	LASPTPNTLE
MELA_SHECO			MASEQNP	LGLLGIEFTE	FATPDLDPMH
PEA3_MOUSE	PAQTPGPQVS	ASARGPGPVA	GGSGRMERRM	KGGYL---DQ	RVPTYTFCSSK
	110	120	130	140	150
10 HPPD_Hv	LGAPLAARSD	LSTGNSAHAS	QLLRSGSLAF	LFT--APYAN	G-CDAA----
HPPD_Ath	LGMRFSAKSD	LSTGNMVHAS	YLLTSGDLRF	LFT--APYSP	S-LSAGEIKP
HPPD_HUMAN	MGFEPLAYRG	LETGSREVVS	HVIKQGKIVF	VLS--SA---	-----LNP
HPPD_RAT	MGFEPLAYKG	LETGSREVVS	HVIKQGKIVF	VLC--SA---	-----LNP
HPPD_PIG	IGFEPLAYKG	LETGSREVVS	HVVKQDKIVF	VFS--SA---	-----LNP
HPPD_MOUSE	MGFEPLAYRG	LETGSREVVS	HVIKRGKIVF	VLC--SA---	-----LNP
15 HPPD_PSESP	PIFEIMGFTK	VATHRSKDV-	HLYROGAINL	ILN--NE---	-----
MELA_SHECO	KVFIDFGFSK	LKKHKQKDI-	VYYKQNDINF	LLN--NE---	-----
PEA3_MOUSE	PGNGSLGEAL	MVPQKGKMDP	GSLPPSDSED	LFQDLSHFQE	TWLAEAQVPD
	160	170	180	190	200
HPPD_Hv	--TASLPSFS	ADAARRFSAD	HGIAVRSVAL	RVADAAEAFA	ASRRRGARPA
HPPD_Ath	TTTASIPSFD	HGSCRSFFSS	HGLGVRVAI	EVEDAESAFS	ISVANGAIPS
20 HPPD_HUMAN	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDYIVQ	KARERGAKIM
HPPD_RAT	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCEHIVQ	KARERGAKIV
HPPD_PIG	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDYIVQ	KARERGAIIV
HPPD_MOUSE	-----WN	KEMGDHL-VK	HGDGVKDIAF	EVEDCDHIVQ	KARERGAKIV
HPPD_PSESP	-----P	HSVASFYAAE	HGPSVCGMAF	RVKDSQKAYK	RALELGAQPI
MELA_SHECO	-----K	QGFSQAFAKT	HGPAISSMGW	RVEDANFAFE	GAVARGAKPA
25 PEA3_MOUSE	SDEQFVPDFH	---SENLAFFH	SPTTRIKKEP	QSPRTDPALS	CSRKPPLPYH
	210	220	230	240	250
HPPD_Hv	FAPV-----	-----DLGRG	FAPAEVELYG	--DVVLRVFS	HP--DG--TD
HPPD_Ath	SPPI-----	-----VLNEA	VTIAEVKLYG	--DVVLRVFS	YKAEDT--EK
HPPD_HUMAN	REP-----	--WVEQDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KMN-----YI
HPPD_RAT	REP-----	--WVEQDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KIN-----YT
30 HPPD_PIG	REEVC-CAAD	VRGHHTPLDR	AR----QVWE	--GT---LVE	KMT-----FC
HPPD_MOUSE	REP-----	--WVEQDKFGK	VKFAVLQTYG	--DTHTLVE	KIN-----YT
HPPD_PSESP	HI-----	-----ETGPME	LNLPAIKGIG	--GAPLYLID	RFEGESSIYD
MELA_SHECO	AD-----	-----EV--KD	LPYPAIYGIG	--DSLIIYFID	TFGDDNNIYT
PEA3_MOUSE	HGEQCLYSRQ	IAIKSPAPGA	PGQSPLQFFS	RAEQQSSLLR	ASSSSQSHPG
	260	270	280	290	300
35 HPPD_Hv	VPFLPGFEGV	TNPDA----	VDYGLTRFDH	VVGNNP--EL	-APAAAYIAG
HPPD_Ath	SEFLPGFERV	EDASSF---P	LDYGIRRLDH	AVGNVP--EL	-GPALTYVAG
HPPD_HUMAN	GQFLPGYEAP	AFMDPLLPKL	PKCSLEMIDH	IVGNQPDQEM	-VSASEW---
HPPD_RAT	GRFLPGFEAP	TYKDTLLPKL	PSCNLEIIDH	IVGNQPDQEM	-ESASEW---
HPPD_PIG	LDSRPQPSQT	LLHRLLLSKL	PKCGLEIIDH	IVGNQPDQEM	-ESASQW---
40 HPPD_MOUSE	GRFLPGFEAP	TYKDTLLPKL	PRCNLEIIDH	IVGNQPDQEM	-QSASEW---
HPPD_PSESP	IDFV--FLEG	VDRHPVGA--	---GLKIIDH	LTHNVYRGRM	-A---YWANF
MELA_SHECO	SDF-----EA	LDEPIITQ--	-EKGFIIEVDH	LTNNVHKGTM	-E---YWSNF
PEA3_MOUSE	HGYLGEHSSV	FQQPVDMCHS	FTSPQGGGRE	PLPAPYQHQL	SEPCPPYPQQ
	310	320	330	340	350
HPPD_Hv	FT---GFHEF	AEFTAEDVGT	TESGLNSVVL	ANNSEGVLPP	LNEPVHGTKR
45 HPPD_Ath	FT---GFHQF	AEFTADDVGT	AESGLNSAVL	ASNDEMVLPP	INEPVHGTKR
HPPD_HUMAN	YLKNLQFHFRF	WSVDDTQVHT	EYSSLSRIVV	ANYEESIKMP	INEPAPG-KK
HPPD_RAT	YLKNLQFHFRF	WSVDDTQVHT	EYSSLSRIVV	ANYEESIKMP	INEPAPG-RK
HPPD_PIG	YMRNLQFHFRF	WSVDDTQIHT	EYSALRSVVM	ANYEESIKMP	INEPAPG-KK

25

	HPPD_MOUSE	YLKNLQFHFR	WSVDDTQVHT	EYSSLRISIV	TNYEESIKMP	INEPAPG-RK
	HPPD_PSESP	YEKLFNFREI	RYF---DIKG	EYTGLTSKAM	TAPDGMIRIP	LNE--ESSKG
	MELA_SHECO	YKDIFGFTEV	RYF---DIKG	SQTALISYAL	RSPDGSFCIP	INE--GKGDD
	PEA3_MOUSE	NFKQ-EYHDP	LYEQAGQPAS	SQGGVSGHRY	PGAGVVIKQE	RTDFAYDSDV
5		360	370	380	390	400
	HPPD_Hv	RSQIQTFLEH	HGGPGVQH-I	AVASSDVLRT	LRKMRARSAM	GGFDFLPPPL
	HPPD_Ath	KSQIQTYLEH	NEGAGLQH-L	ALMSIEDIFRT	LREMRKRSSI	GGFDFMPSPP
	HPPD_HUMAN	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIIITA	IRHLRER---	-GLEFLSVP-
	HPPD_RAT	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALRTEDIITT	IRHLRER---	-GMEFLAVP-
	HPPD_PIG	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIIITA	IRSLRER---	-GVEFLAVP-
	HPPD_MOUSE	KSQIQEYVDY	NGGAGVQH-I	ALKTEDIIITA	IRHLRER---	-GTEFLAAP-
10	HPPD_PSESP	AGQIEEFLMQ	FNGEGIQH-V	AFLSDDLIKT	WDHLKSI---	-GMRFMTAPP
	MELA_SHECO	RNQIDEYLKE	YDGPVQH-L	AFRSRDIVAS	LDAMEGS---	-SIQTLDIIP
	PEA3_MOUSE	PGCASYLHP	EGFSGPSPGD	GVMGYGYEKS	LRPFDDVCI	VPKKFEGDIK
		410	420	430	440	450
	HPPD_Hv	PKYYEGVRL	AGD--VLSEA	QIKECQELGV	LVDRDDQG--	--VLL-----
15	HPPD_Ath	PTYQNLKKR	VGD--VLSDD	QIKECEELGI	LVDRDDQG--	--TLL-----
	HPPD_HUMAN	STYYKQLREK	LKTAKIKVKE	NIDALEELKI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_RAT	SSYYRLLREN	LKTSKIQVKE	NMDVLEELKI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_PIG	FTYYKQLQEK	LKSAKIRVKE	SIDVLEELKI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_MOUSE	SSYYKLLREN	LKSAKIQVKE	SMDVLEELHI	LVDDYDEKG--	--YLL-----
	HPPD_PSESP	DTYYEMLEGR	LPN----HGE	PVGELQARGI	LLDGSSSESGD	KRLL-----
	MELA_SHECO	E-YYDTIFEK	LPQ-----VTE	DRDRIKHQI	LVDDGEDG--	--YLL-----
20	PEA3_MOUSE	QEGIGAFREG	PPYQR-----	-RGALQLWQF	LVALLDPTN	AHFIAWTGRG
		460	470	480	490	500
	HPPD_Hv	QIFTKPVGDR	PTLFLEMIQR	IGCMKDERG	EE----YQKG	GCGGFGKGNF
	HPPD_Ath	QIFTKPLGDR	PTIFIEIIQR	VGCMKDEEG	KA----YQSG	GCGGFGKGNF
	HPPD_HUMAN	QIFTKPVQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----	---GFGAGNF
25	HPPD_RAT	QIFTKPMQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----	---GFGAGNF
	HPPD_PIG	QIFTKPMQDR	PTVFLEVIQR	NNHQ-----	-----	---GFGAGNF
	HPPD_MOUSE	QIFTKPMQDR	PTLFLEVIQR	HNHQ-----	-----	---GFGAGNF
	HPPD_PSESP	QIFSETLMGP	--VFFEFIQR	-----KGDD-	-----	---GFGEGNF
	MELA_SHECO	QIFTKNLFGP	--IFIEIIQR	-----KNNL-	-----	---GFGEGNF
	PEA3_MOUSE	MEFKLIEPEE	VARLWGIQKN	RPAMNYDKLS	RSLRYYYEKG	IMQKVAGERY
30		510	520	530	540	550
	HPPD_Hv	-----SE	LFK-SIE-DY	--EKS--LEA	KQSAAV-QGS	
	HPPD_Ath	-----SE	LFK-SIE-EY	--EKT--LEA	KQLVG	
	HPPD_HUMAN	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--NLRGNLTN	METNGVPPGM	
	HPPD_RAT	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--ALRG		
	HPPD_PIG	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--ELRGNLTD	TDPNGVPFRL	
35	HPPD_MOUSE	-----NS	LFK-AFEEEEQ	--ALRGNLTD	LEPNGVRSKM	
	HPPD_PSESP	-----KA	LFE-SIERDQ	--VRRGVLST	-D	
	MELA_SHECO	-----KA	LFE-SIERDQ	--VRRGVL		
	PEA3_MOUSE	VYKFVCEPEA	LFSLAFFDNQ	RPALKAEDR	PVSEEDTVPL	SHLDESPAYL
		560	570			
40	HPPD_Hv					
	HPPD_Ath					
	HPPD_HUMAN					
	HPPD_RAT					
	HPPD_PIG					
	HPPD_MOUSE					
	HPPD_PSESP					
45	MELA_SHECO					
	PEA3_MOUSE	PELTGPAPPF	GHRGGYSY			

26

- Erläuterung:
- HPPD_Hv: *Hordeum vulgare* 4-hydroxyphenylpyruvate
dioxygenase (HvSD36)
HPPD_Ath: *Arabidopsis thaliana* 4-hydroxyphenylpy-
ruvate dioxygenase
5 HPPD_HUMAN: *H.sapiens* 4-hydroxyphenylpyruvate
dioxygenase
HPPD_PIG: Pig 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
HPPD_RAT: Rat F alloantigen
HPPD_MOUSE: Mouse 4-hydroxyphenylpyruvate dioxy-
10 genase
MELA_SHECO: *S. colwelliana* mela protein
HPPD_PSESP: *Pseudomonas* sp. (strain P.J.874)
4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
PEA3_MOUSE: *Mus musculus* (mouse) PEA3 polypeptide
15
- Die größte Homologie wurde zu der *Arabidopsis* Sequenz
gefunden mit 58 % über die gesamte Sequenz (62 % über 412
As), gefolgt von HPPD_RAT mit 35 % (über 365 As),
HPPD_HUMAN 34 % (über 365 AS), HPPD_MOUSE 34 % (über 371
20 As).

Beispiel 4

Anzucht von Gerste (*Hordeum vulgare*)

- 25 Gerstensetzlinge (*Hordeum vulgare* L., cv. Carina, Ackermann Saat-
zucht, Irbach, Germany) wurden über einen Zeitraum von 15 Tagen
unter kontrollierten Bedingungen in der Klimakammer in sogenann-
ten Mitscherlich-Töpfen in Erde, die 4 g pro Liter Osmocote 5M
(Urania, Hamburg, Germany) enthielt, angezogen. Um einheitliches
30 Wachstum sicherzustellen, wurden die Samen auf feuchtem Filterpa-
pier im Dunkeln für 2 Tage bei 4°C und 1 Tag bei 21°C ausgekeimt
und nur solche Setzlinge eingesetzt, die gleiches Längenwachstum
der Primärwurzel zeigten. Nach dem Transfer dieser Setzlinge auf
Erde wurden diese mit 1.5 cm gesiebter Erde bedeckt. Danach wur-
35 den die Pflanzen über 9 Tage bei 16 Stunden Licht ($120 \mu\text{m} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)
und 8 Stunden Dunkelheit verbunden mit einem Temperaturschift
(21°C bei Tag, 16°C bei Nacht) inkubiert. Um Seneszenz zu induzie-
ren, werden die Pflanzen nach 9 Tagen für 2 Tage (Tag 10 und 11)
im Dunkeln bei der obengenannten Temperatur gehalten.

40

Beispiel 5

Anzucht von Tabak

- Die Tabakpflanzen wurden nach bekannter Methode angezogen. Die
45 verwendete Tabaksorte ist *Nicotiana tabacum*, cv. Xanthi.

Beispiel 6

Transformation von Tabak

Die erfindungsgemäße Expressionskassette enthaltend das HPPD-Gen mit der Sequenz 1 wurde in den Vektor pBinAR-Hyg kloniert (Abb. 4). Mit diesem Vektor wurden Tabakpflanzen gemäß Beispiel 5 anschließend nach bekannter Methode transformiert.

Beispiel 7

10 Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Tabak

Die cDNA der HPPD wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Tabak unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolin-
15 genes verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Tabaksamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Tabakpflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der α -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen
20 konzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

25

30

35

40

45

Abbildung 1

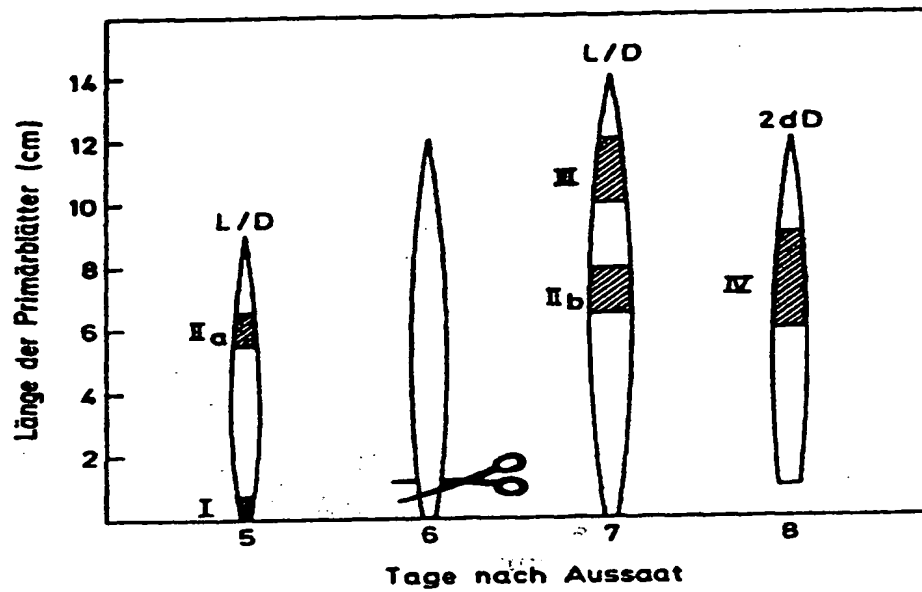


Abbildung 2

I IIa IIb III IV

3100 nt →

1600 nt →



Abbildung 3

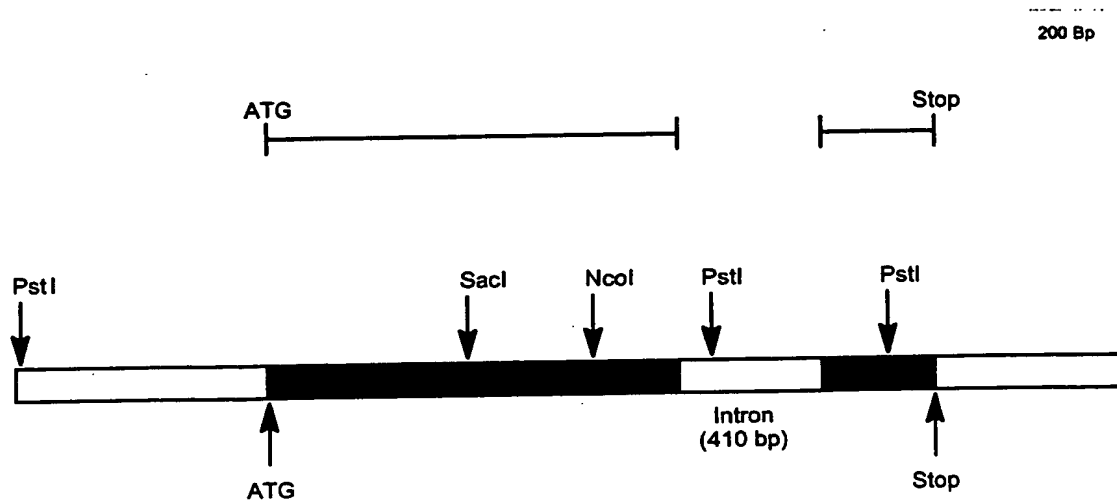
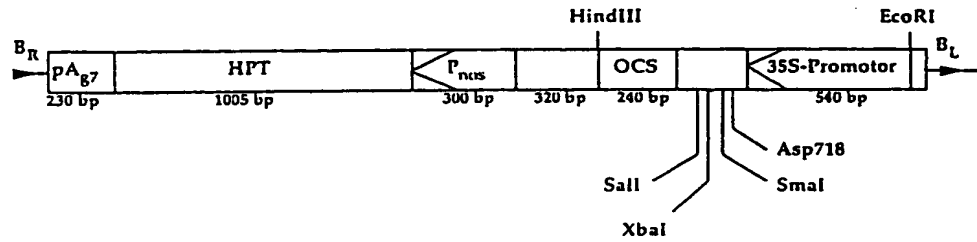


Abbildung 4

A.



B.

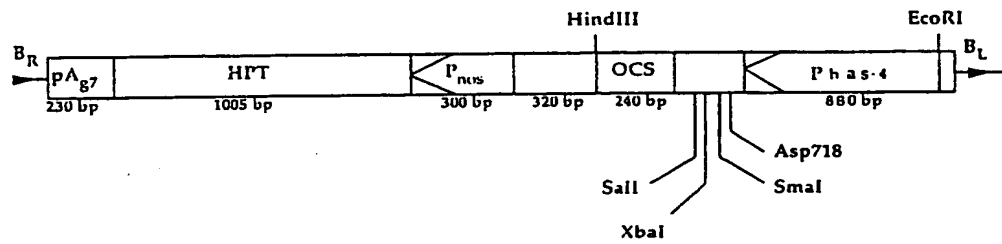


Abbildung 5



Abbildung 6

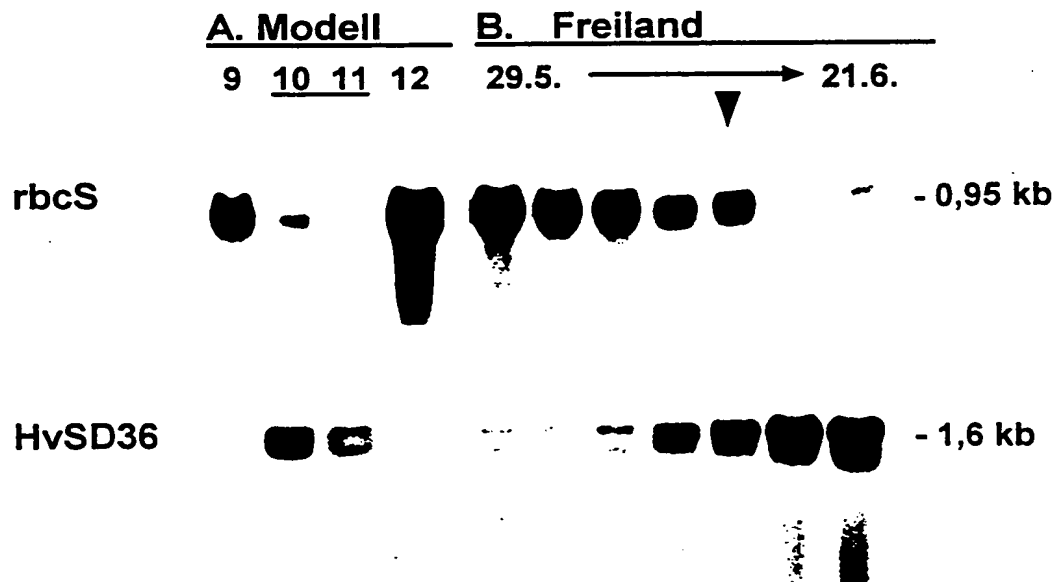
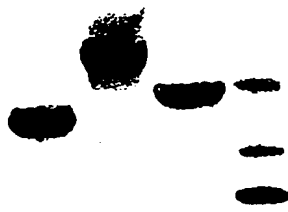


Abbildung 7

B E H X



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (D) BUNDESLAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 67056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698

(ii) ANMELDETITEL: HPPD Sequenz aus Gerste

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1565 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: hppd aus Gerste
- (D) ENTWICKLUNGSSTADIUM: senescence

UNMITTELBARE HERKUNFT:

- (A) BIBLIOTHEK: lambda FIXII-Bank der Gerste
- (B) CLON: pHvSD36.seq

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LÄGE: 9..1313

(x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTORS: Krupinska, Karin
- (B) TITEL: Overexpression of HPPD
- (C) ZEITSCHRIFT: overexpression of HPPD
- (G) DATUM: 1998
- (K) BELANGREICHE RESTE IN SEQ ID NO: 1: VON 1 BIS 1565

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGCACACC ATG CCG CCC ACC CCC ACC ACC CCC GCG GCT ACC GGC GCC GCC
 Met Pro Pro Thr Pro Thr Thr Pro Ala Ala Thr Gly Ala Ala
 1 5 10

GCC Ala 15	GCG Ala	GTG Val	ACG Thr	CCG Pro	GAG Glu 20	CAC His	GCG Ala	CGA Arg	CCG Pro	CAC His 25	CGA Arg	ATG Met	GTC Val	CGC Arg	TTC Phe 30	98
AAC Asn	CCG Pro	CGC Arg	AGC Ser	GAC Asp 35	CGC Arg	TTC Phe	CAC His	ACG Thr	CTC Leu 40	TCC Ser	TTC Phe	CAC His	CAC His	GTC Val 45	GAG Glu	146
TTC Phe	TGG Trp	TGC Cys 50	GCG Ala	GAC Asp	GCC Ala	GCC Ala	TCC Ser	GCC Ala	GCC Ala	GGC Gly	CGC Arg	TTC Phe	GCG Ala 60	TTC Phe	GCG Ala	194
CTC Leu	GGC Gly	GCG Ala 65	CCG Pro	CTC Leu	GCC Ala	GCC Ala	AGG Arg 70	TCC Ser	GAC Asp	CTC Leu	TCC Ser	ACG Thr 75	GGG Gly	AAC Asn	TCC Ser	242
GCG Ala 80	CAC His	GCC Ala	TCC Ser	CAG Gln	CTG Leu 85	CTC Leu	CGC Arg	TCG Ser	GGC Gly	TCC Ser	CTC Leu 90	GCC Ala	TTC Phe	CTC Leu	TTC Phe	290
ACC Thr 5	GCG Ala	CCC Pro	TAC Tyr	GCC Ala	AAC Asn 100	GGC Gly	TGC Cys	GAC Asp	GCC Ala	GCC Ala 105	ACC Thr	GCC Ala	TCC Ser	CTG Leu	CCC Pro 110	338
TCC Ser	Phe	TCC Ser	GCC Ala	GAC Asp 115	GCC Ala	GCG Ala	CGC Arg	CGG Arg	TTC Phe 120	TCC Ser	GCC Ala	GAC Asp	CAC His	GGG Gly 125	ATC Ile	386
GCG Ala	GTG Val	CGC Arg	TCC Ser 130	GTA Val	GCG Ala	CTG Leu	CGC Arg	GTC Val 135	GCA Ala	GAC Asp	GCC Ala	GCC Ala	GAG Glu 140	GCC Ala	TTC Phe	434
CGC Arg	GCC Ala	AGT Ser 145	CGT Arg	CGA Arg	CGG Arg	GGC Gly	GCG Ala	CGC Arg	CCG Pro	GCC Ala	TTC Phe	GCC Ala 155	CCC Pro	GTG Val	GAC Asp	482
CTC Leu 160	GGC Gly	CGC Arg	GGC Gly	TTC Phe	GCG Ala	TTC Phe 165	GCG Ala	GAG Glu	GTC Val	GAG Glu 170	CTC Leu	TAC Tyr	GGC Gly	GAC Asp	GTC Val	530
GTG Ala 175	CTC Arg	CGC Phe	TTC Phe	GTC Val	AGC Ser 180	CAC His	CCG Pro	GAC Asp	GGC Gly	ACG Thr 185	GAC Asp	GTG Val	CCC Pro	TTC Phe	TTG Leu 190	578
CCG Pro	GGG Gly	TTC Phe	GAG Glu	GGC Gly 195	GTA Val	ACC Thr	AAC Asn	CCG Pro	GAC Asp 200	GCC Ala	GTG Val	GAC Asp	TAC Tyr	GGC Gly 205	CTG Leu	626
ACG Thr	CGG Arg	TTC Phe	GAC Asp 210	CAC His	GTC Val	GTC Val	GGC Gly	AAC Asn 215	GTC Val	CCG Pro	GAG Glu	CTT Leu	GCC Ala 220	CCC Pro	GCC Ala	674
GCA Ala	GCC Ala	TAC Tyr 225	ATC Ile	GCC Ala	GGG Gly	TTC Phe 230	ACG Thr	GGG Gly	TTC Phe	CAC His	GAG Glu	TTC Phe 235	GCC Ala	GAG Glu	TTC Phe	722
ACG Thr 240	GCG Ala	GAG Glu	GAC Asp	GTG Val	GGC Gly	ACG Thr 245	ACC Thr	GAG Glu	AGC Ser	GGG Gly	CTC Leu 250	AAC Asn	TCG Ser	GTG Val	GTG Val	770
CTC Leu 255	GCC Ala	AAC Asn	AAC Asn	TCG Ser	GAG Glu 260	GGC Gly	GTG Val	CTG Leu	CTG Leu	CCG Pro 265	CTC Leu	AAC Asn	GAG Glu	CCG Pro	GTG Val 270	818

CAC	GGC	ACC	AAG	CGC	CGG	AGC	CAG	ATA	CAG	ACG	TTC	CTG	GAA	CAC	CAC	866
His	Gly	Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Phe	Leu	Glu	His	His	
				275					280					285		
GGC	GGC	CCG	GGC	GTG	CAG	CAC	ATC	GCG	GTG	GCC	AGC	AGT	GAC	GTG	CTC	914
Gly	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	
			290					295					300			
AGG	ACG	CTC	AGG	AAG	ATG	CGT	GCG	CGC	TCC	GCC	ATG	GGC	GGC	TTC	GAC	962
Arg	Thr	Leu	Arg	Lys	Met	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Gly	Gly	Phe	Asp	
		305					310					315				
TTC	CTG	CCA	CCC	CCG	CTG	CCG	AAG	TAC	TAC	GAA	GGC	GTG	CGA	CGC	CTT	1010
Phe	Leu	Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	
	320					325					330					
GCC	GGG	GAT	GTC	CTC	TCG	GAG	GCG	CAG	ATC	AAG	GAA	TGC	CAG	GAG	CTG	1058
Ala	Gly	Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Glu	Leu	
335					340					345					350	
GGT	GTG	CTC	GTC	GAT	AGG	GAC	GAC	CAA	GGG	GTG	TTG	CTC	CAA	ATC	TTC	1106
Gly	Val	Leu	Val	Asp	Arg	Asp	Asp	Gln	Gly	Val	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	
				355					360					365		
ACC		CCA	GTA	GGG	GAC	AGG	CCG	ACC	TTG	TTC	CTG	GAG	ATG	ATC	CAG	1154
Thr	Lys	Pro	Val	Gly	Asp	Arg	Pro	Thr	Leu	Phe	Leu	Glu	Met	Ile	Gln	
			370					375					380			
AGG	ATC	GGG	TGC	ATG	GAG	AAG	GAC	GAG	AGA	GGG	GAA	GAG	TAC	CAG	AAG	1202
Arg	Ile	Gly	Cys	Met	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg	Gly	Glu	Glu	Tyr	Gln	Lys	
		385					390					395				
GGT	GGC	TGC	GGC	GGG	TTC	GGC	AAA	GGC	AAC	TTC	TCC	GAG	CTG	TTC	AAG	1250
Gly	Gly	Cys	Gly	Gly	Phe	Gly	Lys	Gly	Asn	Phe	Ser	Glu	Leu	Phe	Lys	
	400					405					410					
TCC	ATT	GAA	GAT	TAC	GAG	AAG	TCC	CTT	GAA	GCC	AAG	CAA	TCT	GCT	GCA	1298
Ser	Ile	Glu	Asp	Tyr	Glu	Lys	Ser	Leu	Glu	Ala	Lys	Gln	Ser	Ala	Ala	
415					420				425						430	
GTT	CAG	GGA	TCA	TAGGATAGAA GCTGGTCCTT GTATCATGGT CTCATGGAGC												1350
1		Gly	Ser		435											
AAAAGAAAAC AATGTTGTTT GTAATATGCG TCGCACAATT ATATCAATGT TATAATTGGT																1410
GAAGCTGAAG ACAGATGTAT CCTATGTATG ATGGGTGTAA TGGATGGTAG AGGGGCTCAC																1470
ACATGAAGAA AATGTAGCGT TGACATTGTT GTACAATCTT GCTTGCAAGT AAAATAAAGA																1530
ACAGATTTTG AGTTCTGCAA AAAAAAAAAA AAAAA																1565

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 434 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Pro	Pro	Thr	Pro	Thr	Thr	Pro	Ala	Ala	Thr	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	
1				5					10					15		
Val	Thr	Pro	Glu	His	Ala	Arg	Pro	His	Arg	Met	Val	Arg	Phe	Asn	Pro	
			20					25					30			
Arg	Ser	Asp	Arg	Phe	His	Thr	Leu	Ser	Phe	His	His	Val	Glu	Phe	Trp	
		35					40					45				
Cys	Ala	Asp	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ala	Leu	Gly	
	50					55					60					
Ala	Pro	Leu	Ala	Ala	Arg	Ser	Asp	Leu	Ser	Thr	Gly	Asn	Ser	Ala	His	
65					70					75					80	
Ala	Ser	Gln	Leu	Leu	Arg	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Phe	Thr	Ala	
				85					90					95		
Pro	Tyr	Ala	Asn	Gly	Cys	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Ser	Leu	Pro	Ser	Phe	
			100					105					110			
Ser	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Asp	His	Gly	Ile	Ala	Val	
		115					120					125				
Arg	Val	Ala	Leu	Arg	Val	Ala	Asp	Ala	Ala	Glu	Ala	Phe	Arg	Ala		
130					135					140						
Ser	Arg	Arg	Arg	Gly	Ala	Arg	Pro	Ala	Phe	Ala	Pro	Val	Asp	Leu	Gly	
145					150				155						160	
Arg	Gly	Phe	Ala	Phe	Ala	Glu	Val	Glu	Leu	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Leu	
				165					170					175		
Arg	Phe	Val	Ser	His	Pro	Asp	Gly	Thr	Asp	Val	Pro	Phe	Leu	Pro	Gly	
			180					185					190			
Phe	Glu	Gly	Val	Thr	Asn	Pro	Asp	Ala	Val	Asp	Tyr	Gly	Leu	Thr	Arg	
		195					200					205				
Phe	Asp	His	Val	Val	Gly	Asn	Val	Pro	Glu	Leu	Ala	Pro	Ala	Ala	Ala	
	210					215					220					
Ty	Ala	Gly	Phe	Thr	Gly	Phe	His	Glu	Phe	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala		
225				230					235					240		
Glu	Asp	Val	Gly	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Leu	Asn	Ser	Val	Val	Leu	Ala	
				245					250					255		
Asn	Asn	Ser	Glu	Gly	Val	Leu	Leu	Pro	Leu	Asn	Glu	Pro	Val	His	Gly	
			260					265					270			
Thr	Lys	Arg	Arg	Ser	Gln	Ile	Gln	Thr	Phe	Leu	Glu	His	His	Gly	Gly	
		275					280					285				
Pro	Gly	Val	Gln	His	Ile	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Asp	Val	Leu	Arg	Thr	
	290					295					300					
Leu	Arg	Lys	Met	Arg	Ala	Arg	Ser	Ala	Met	Gly	Gly	Phe	Asp	Phe	Leu	
305					310					315					320	
Pro	Pro	Pro	Leu	Pro	Lys	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Val	Arg	Arg	Leu	Ala	Gly	
				325					330					335		
Asp	Val	Leu	Ser	Glu	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Cys	Gln	Glu	Leu	Gly	Val	

340

345

350

Leu Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Val Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys
355 360 365

Pro Val Gly Asp Arg Pro Thr Leu Phe Leu Glu Met Ile Gln Arg Ile
370 375 380

Gly Cys Met Glu Lys Asp Glu Arg Gly Glu Glu Tyr Gln Lys Gly Gly
385 390 395 400

Cys Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile
405 410 415

Glu Asp Tyr Glu Lys Ser Leu Glu Ala Lys Gln Ser Ala Ala Val Gln
420 425 430

Gly Ser

DNA-Sequenz codierend für ein Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase-Gen
und dessen Überproduktion in Pflanzen

5 Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E
Biosyntheseleistung durch Überexpression eines pflanzlichen HPPD-
Gens aus Gerste.

10

15

20

25

30

35

40

45

This Page Blank (uspto)